

学位論文の要約

Phasic synaptic incorporation of GluR2-lacking AMPA receptors  
at gonadotropin-releasing hormone neurons is involved in the  
generation of the luteinizing hormone surge in female rats

(GnRH ニューロンにおける GluR2 欠損型 AMPA 受容体の  
性周期に伴うシナプス移行の解析)

Yoko Kuroki

黒木 洋子

Physiology

Yokohama City University Graduate School of Medicine

横浜市立大学 大学院医学研究科 医科学専攻 生理学

( Doctoral Supervisor : Takuya Takahashi, Professor )

( 指導教員 : 高橋 琢哉教授 )

## 学位論文の要約

Phasic synaptic incorporation of GluR2-lacking AMPA receptors at gonadotropin-releasing hormone neurons is involved in the generation of the luteinizing hormone surge in female rats

(GnRH ニューロンにおける GluR2 欠損型 AMPA 受容体の  
性周期に伴うシナプス移行の解析)

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306452213005460>

### 1. 序論

生殖が成り立つためには、エストロゲン上昇によるポジティブフィードバックに応答し GnRH ニューロンが活性化され、排卵前に強く適切な黄体ホルモンの上昇 (LH サージ) が必要である。しかしながら、GnRH/LH サージ発生の神経学的分子基盤は未だ解明されていない。グルタミンが LH サージ発生に関与することは報告されているが (Iremonger et al., 2010), グルタミンがどのように LH サージを調整しているのかは不明である。

グルタミンによる興奮性シナプス伝達には主に AMPA 受容体 ( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor) によって行われる。なかでも GluR2 欠損型 Ca<sup>2+</sup>透過性 AMPA 受容体 (CP-AMPA 受容体) の量的変化はシナプスの可塑性に非常に重要な役割を担っている (Bowie and Mayer, 1995)。本研究では、ラットを用いて GnRH ニューロンでの性周期に伴う CP-AMPA 受容体の後シナプスにおける量的変化を明らかにした。

### 2. 実験材料と方法

#### 動物

Wistar ラット (7-8 週) を使用し、電気生理学実験では GnRH プロモーターによって eGFP タグを遺伝子導入したラットを使用した (Kato et al., 2003)。性周期を特定するために、膣スメアを毎日行った。卵巣切除したラットでは、卵胞ホルモン (エストラジオール) の処置は 20% 17 $\beta$ -estradiol 含有シリコン製チューブを皮下に留置後 3 日後にイソフルラン麻酔下に正午ごろ行った (Nishihara et al., 1994)。

## 脳手術

ペントバルビタール麻酔下に両側カニューレションガイドシステムを視索前野に定位的に留置した。1ul の生食に溶解した 3mmol NASPM (CP-AMPA 受容体選択的拮抗薬) を視索前野に留置したカニューレから朝 9 時に投与した。同量の生食をコントロール群にも投与し、後日投与部位を確認した。

## 電気生理学実験

イソフルラン麻酔下にラットの脳を取り出し、すばやく 5% CO<sub>2</sub>/95% O<sub>2</sub> でバブリングされた dissection buffer に移した。dissection buffer 内で脳を冠状に切除し、physiological solution へ移した。記録用チャンバーはベースの活動性を抑えるために 0.1 mM picrotoxin, 4 μM 2-chloroadenosine を加えた ACSF で灌流した。Axopatch-1D amplifier を用いて GnRH ニューロンからホールセルパッチを行った。

## 3. 結果と考察

雄と雌のトランスジェニックラットの急性脳スライスを用意し、終板器官の刺激に反応した GnRH ニューロンのホールセルパッチを行った。AMPA 受容体の移行を示す rectification index (RI: response at -60 mV/response at +40 mV) を測定した。雄ラットや他の性周期の雌ラットに比べ、発情前の雌ラットにおいて RI の増加を認めた (図 1)。このことは、発情前期に GnRH ニューロンにおいて CP-AMPA 受容体がシナプスに挿入されることを示している。このことから、発情前の血中エストロゲン濃度上昇には CP-AMPA 受容体のシナプスへの挿入が必要であると仮説を立てた。これを確かめるために、卵巣切除したラット(OVX)を LH サージが起こる量のエストラジオールで刺激した。RI はエストラジオールで刺激した OVX の方が、溶媒を投与したラットよりも顕著に高くなった。このことは、発情前一過性にエストラジオールが上昇することによって、GnRH ニューロンにおいて CP-AMPA 受容体がシナプスに挿入されることを示している。

次に CP-AMPA 受容体拮抗薬である NASPM 処理をした前後での、AMPA 受容体を介したシナプス応答を性周期の各時期で解析した。生食に比べ NASPM 処理後では発情前のみ AMPA 受容体の応答は減弱した (図 2)。このことは、発情前期のみ CP-AMPA 受容体が、GnRH ニューロンにおける AMPA 受容体を介するシナプス伝達に寄与することを示している。従って、グルタミン作動性シナプスは発情前期に一過性に強化される。

さらに、LH サージの起こる発情前のラットで、CP-AMPA 受容体がシナプスに挿入される影響を見るために、発情前の GnRH ニューロンで CP-AMPA 受容体のシナプスでの増加が LH サージに必要なかどうかを調べた。NASPM を発情前のラットの視索前野に投与し、血清 LH レベルを継続的に測定した。NASPM 投与は著しく LH サージを減弱した (図 3)。このことは、CP-AMPA 受容体でのシナプス伝達が LH サージに関わっていることを裏付けている。

本研究は、発情前のラットにおいて GnRH ニューロンで CP-AMPA 受容体が増加することを明らかにした。また、CP-AMPA 受容体拮抗薬を用いて LH サージが抑制されたことから、GnRH ニューロンにおいて CP-AMPA 受容体のシナプス移行が LH サージの発生に関わっていることを示した。

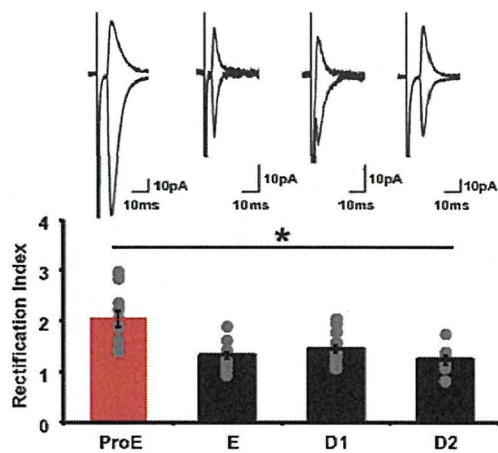


図1 発情前期で CP-AMPA 受容体のシナプス移行が増加する

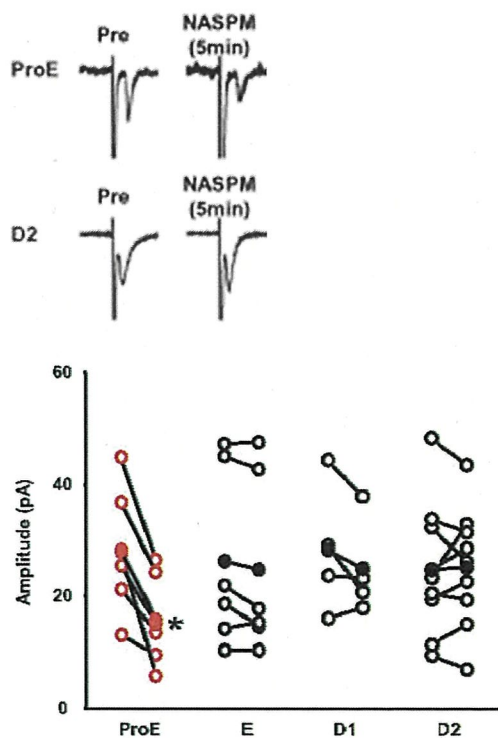


図2 CP-AMPA 受容体を NASPM で阻害したときの変化

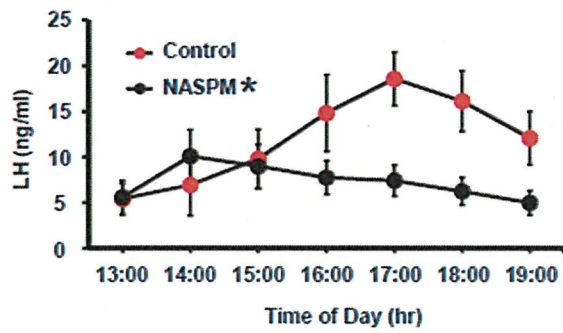


図3 発情前期に NASPM で阻害すると LH サージは著しく減弱する

【引用文献】

- Bowie D, Mayer ML (1995) Inward rectification of both AMPA and kainate subtype glutamate receptors generated by polyaminemediated ion channel block. *Neuron* 15:453–462.
- Iremonger KJ, Constantin S, Liu X, Herbison AE (2010) Glutamate regulation of GnRH neuron excitability. *Brain Res* 1364:35–43.
- Kato M, Ui-Tei K, Watanabe M, Sakuma Y (2003) Characterization of voltage-gated calcium currents in gonadotropin-releasing hormone neurons tagged with green fluorescent protein in rats. *Endocrinology* 144:5118–5125.
- Nishihara M, Sano A, Kimura F (1994) Cessation of the electrical activity of gonadotropin-releasing hormone pulse generator during the steroid-induced surge of luteinizing hormone in the rat. *Neuroendocrinology* 59:513–519.

【論文目録】

I 主論文

Phasic synaptic incorporation of GluR2-lacking AMPA receptors  
at gonadotropin-releasing hormone neurons is involved in the generation of the  
luteinizing hormone surge in female rats

H. TADA\*, Y. KUROKI\*, T. FUNABASHI, Y. KAMIYA, T. GOTO, K. SUYAMA,

A. SANO, D. MITSUSHIMA, A. M. ETGEN AND T. TAKAHASHI :

Neuroscience Vol.248, 664–669, 2013